

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 A61K 31/34, 31/365 C07D 307/92, 493/06		A1	(11) 国際公開番号 WO 94/05283
			(43) 国際公開日 1994年3月17日 (17.03.1994)
(21) 国際出願番号 PCT/JP93/01167		(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) 国際出願日 1993年8月20日 (20. 08. 93)		添付公開書類 国際調査報告書	
(30) 優先権データ 特願平4/234492 1992年9月2日 (02. 09. 92) JP			
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP] 〒100 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者 ; および			
(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 矢野浩史 (YANO, Hiroshi) [JP/JP] 〒194 東京都町田市旭町3-6-6 Tokyo, (JP)			
中西 智 (NAKANISHI, Satoshi) [JP/US] メリーランド州 20852 ロックビル 259 コングレッシュナルレーン +512 Maryland, (US)			
松田 謙 (MATSUDA, Yuzuru) [JP/JP] 〒184 東京都小金井市貫井南町1-22-7 Tokyo, (JP)			
野々村良昭 (NONOMURA, Yoshiaki) [JP/JP] 〒166 東京都杉並区成田東3-36-7 Tokyo, (JP)			
佐々木博之 (SASAKI, Hiroyuki) [JP/JP] 〒247 神奈川県横浜市栄区笠間町1755-3 Kanagawa, (JP)			

(54) Title : ANTI-HIV DRUG

(54) 発明の名称 抗HIV剤

(57) Abstract

An anti-HIV drug containing a myosin light-chain kinase inhibitor such as wortmannin or MS-444 as the active ingredient.

(57) 要約

本発明はウォルトマンニン、MS-444などミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤を有効成分として含有する抗HIV剤に関する

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	CS チェコスロヴァキア	KR 大韓民国	PL ポーランド
AU オーストラリア	CZ ナエコ共和国	KZ カザフスタン	PT ポルトガル
BB バルバードス	DE ドイツ	LI リヒテンシュタイン	RO ルーマニア
BE ベルギー	DK デンマーク	LK スリランカ	RU ロシア連邦
BF ブルキナ・ファソ	ES スペイン	LU ルクセンブルグ	SD スーダン
BG ブルガリア	FI フィンランド	LV ラトヴィア	SE スウェーデン
BJ ベナン	FR フランス	MC モナコ	SI スロヴェニア
BR ブラジル	GA ガボン	MG マダガスカル	SK スロヴァキア共和国
BY ベラルーシ	GB イギリス	ML マリ	SN セネガル
CA カナダ	GN ギニア	MN モンゴル	TD チャード
CF 中央アフリカ共和国	GR ギリシャ	MR モーリタニア	TG トーゴ
CG コンゴー	HU ハンガリー	MW マラウイ	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	NE ニジェール	US 米国
CI コート・ジボアール	IT イタリー	NL オランダ	UZ ウズベキスタン共和国
CM カメルーン	JP 日本	NO ノルウェー	VN ベトナム
CN 中国	KP 朝鮮民主主義人民共和国	NZ ニュージーランド	

明細書

抗 H I V 劑

技術分野

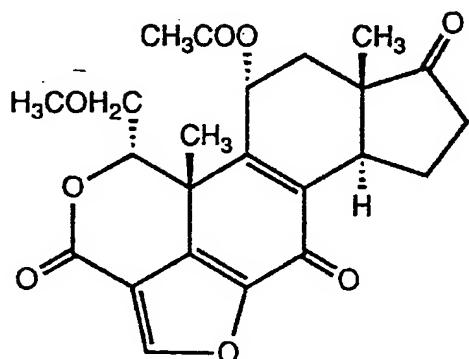
本発明はウォルトマンニン、MS-444などのミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤を有効成分とし、ヒト免疫不全ウイルス(HIV; human immunodeficiency virus)増殖阻害作用を有する抗HIV剤に関する。

背景技術

HIVは後天性免疫不全症候群（AIDS、エイズ）の原因ウイルスである。このウイルスは、ヘルパーT細胞に感染、増殖しその細胞を破壊する。その結果、細胞性免疫不全を起こしエイズ発症に至る。

現在、抗HIV剤としてはアジドチミジン（AZT）、インターフェロンなどが知られている。AZTの作用機構はHIVの生活環（接着、侵入、脱殻、逆転写、組み込み、転写、タンパク質合成、修飾、アッセンブリー、出芽）のうちウイルスに特異的な逆転写の阻害である。しかしながら、AZTは骨髄障害や消化器系または神経系症状などの重篤な副作用を有する。また、インターフェロンはHIVの出芽を阻害することが知られている。

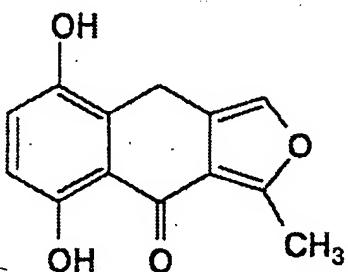
下式で表されるウォルトマンニン



が抗炎症作用 [エクスペリエンチア (Experientia), 30, 135 (1974)]

および血管拡張作用〔ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267, 2157(1992)、特開平3-215423〕を有することが知られている。

下式で表されるMS-444



が血管収縮抑制作用を有することが知られている (WO 93/09109)。

発明の開示

本発明者らは、HIVの生活環のうち宿主細胞の代謝に影響を与える、HIVの代謝のみを特異的に阻害できるステップとして出芽に着目し、鋭意検索を行った結果、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤がHIVの出芽を阻害し、HIVの増殖を抑制することを見出した。

本発明はミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤を有効成分とする抗HIV剤に関する。

ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤としては、たとえばウォルトマンニン、MS-444などがあげられる。

ウォルトマンニンは、ペニシリウム・ウォルトマンニ (*Penicillium wortmannii*) を培地に培養し、培養物中に生成蓄積させ、該培養物中から精製単離することにより得られる [トランサクションズ ブリティッシュマイコロジカル ソサエティー (Trans. Brit. Mycol. Soc.), 40, 365 (1957)、およびジャーナル オブ ケミカル ソサエティー (J. Chem. Soc.) Perkin I, 2898 (1972)]。

また、MS-444は、ミクロモノスpora、エスピー (*Micromonospora* sp.)を培地に培養し、培養物中に生成蓄積させ、該培養物中から精製単離することにより得られる (WO 93/09109)。

つぎに、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤の阻害活性と抗HIV活性についての試験例を示し説明する。

試験例 1

ウォルトマンニンおよびMS-444のミオシン軽鎖キナーゼ阻害活性の測定は、中西らの方法〔アナリティカルバイオケミストリー(Analytical Biochemistry), 195, 313(1991)〕に従った。すなわち、メタノールに溶解した種々の濃度の被検薬溶液10μgを25mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.5 mg/mlウシ血清アルブミン, 4.0mM MgCl₂, 0.2mM CaCl₂, 2.6nM カルモデュリン, 24μM 基質ペプチド(Lys-Lys-Arg-Pro-Gln-Arg-Ala-Thr-Ser-Asn-Val-Phe-Ser-NH₂, 1.5nM ミオシン軽鎖キナーゼを含む反応液200μlに加え28°Cで10分間プレインキュベーションをおこなった。ここに2mM ATP 50μlを加えることで反応を開始し28°Cでインキュベーションした。30分後に、10%酢酸100μlを加えて反応を停止し、リン酸の取り込まれた基質ペプチドの含量(Peptide-P)と取り込まれなかった基質ペプチドの含量(Peptide-non)をHPLCを用いて定量した。阻害率は以下の式に従って算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = (1 - A_x \% / A_c \%) \times 100$$

$$A_x \% : 100 \times (\text{Peptide-P}) / \{ (\text{Peptide-non}) + (\text{Peptide-P}) \}$$

〔被検薬存在時〕

$$A_c \% : 100 \times (\text{Peptide-P}) / \{ (\text{Peptide-non}) + (\text{Peptide-P}) \}$$

〔被検薬非存在時〕

ミオシン軽鎖キナーゼの活性を50%阻害する被検薬濃度(IC₅₀)を第1表に示す

第 1 表

被 検 薬	IC ₅₀ (μM)
ウォルトマンニン	0.17
MS-444	1.0

試験例 2

HIV (III_B タイプ) を感染させたH-9細胞（ヒトリンパ球細胞由来）をウォルトマンニンおよび10%ウシ胎児血清（FBS）を含有するRPMI-1640培地（バイオセル ラボラトリー社製）で37°C、15分間、CO₂インキュベーターで培養した。得られたH-9細胞をRPMI-1640培地で洗浄し、該細胞を10%FBSを含むRPMI-1640培地で37°C、360分間、CO₂インキュベーターで培養後、単位培養液中の逆転写酵素活性を指標にウォルトマンニンによるHIV出芽抑制を検出した。

その結果を第2表に示す。

第 2 表

ウォルトマンニン濃度 (μM)	HIV出芽 (%)
0.1	67
1.0	49
10	39

また、ウォルトマンニン100μMにおいて宿主細胞の増殖は影響を受けなかった。

また、上記試験において、ウォルトマンニンの代わりにMS-444を用い同様に試験した。

その結果を第3表に示す。

第 3 表

MS-444 濃度 (μM)	HIV出芽 (%)
10	95
100	82
1000	20

また、MS-444 1000 μ Mにおいて宿主細胞の増殖は影響を受けなかった。

以上の結果から、本発明の抗HIV剤は優れたHIV増殖抑制活性を有すると同時に有効濃度域において宿主細胞に影響を与えないことが期待される。

ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤はそのままあるいは各種の医薬組成物として経口的または非経口的に投与することができる。このような医薬組成物の剤形としては、たとえば錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、注射剤、点眼剤などがあげられる。

上記剤形の製剤化には、通常知られた方法が適用され、たとえば各種の賦形剤、潤滑剤、結合剤、崩壊剤、懸濁化剤、等張化剤、乳化剤、吸収促進剤などを含有していてもよい。

医薬組成物に使用される担体としてはたとえば水、注射用蒸留水、生理食塩水、グルコース、フラクトース、白糖、マンニット、ラクトース、澱粉、コーンスターク、ポテトスターク、セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、アルギン酸、タルク、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、尿素、シリコン樹脂、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステルなどがあげられ、これらは製剤の種類に応じて適宜選択される。

上記目的のために用いるミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤の投与量は、目的とする治療効果、投与方法、投与期間、年齢、体重などにより決められるが、経口もしくは非経口（例、注射、点滴、坐剤による直腸投与、皮膚貼付など）的投与方法により、通常成人1日当たり0.01～2 mg/kgである。

ウォルトマンニンの急性毒性 (LD_{50})はラット経口投与において3～10mg/kgである [エクスペリエンチア(Experientia), 30, 135 (1974)]。

MS-444の急性毒性はラットの経口投与 (300mg/kg) 及び腹腔内投与 (100mg/kg) で認められなかった。

発明を実施するための最良の形態

実施例 1 錠剤

ウォルトマンニン	100 g
ラクトース	40 g
コーンスターク	18 g
カルボキシメチルセルロースカルシウム	10 g

上記混合物に10%ヒドロキシプロピルセルロース溶液42mlを加えて練合する。この練合液を1.0mmのバスケットを取り付けた押しだし造粒機で造粒し、ステアリン酸マグネシウムを加えて打錠用顆粒とし、常法により1錠剤中(170mg)にウォルトマンニンを100mg含む8mm径の錠剤とした。

実施例 2 カプセル剤

ウォルトマンニン	50 g
ラクトース	80 g
ポテトスターク	38 g

上記混合物に、10%ヒドロキシプロピルセルロース溶液42mlを加えて練合する。実施例1と同様に造粒し、ステアリン酸マグネシウムを加え常法により1カプセル(170mg)中ウォルトマンニン50mg含むカプセル剤とした。

実施例 3 ソフトカプセル剤

10 gのウォルトマンニンを100 gの大豆油に溶かし、得られる溶液を常法によりカプセルに注入することにより、1カプセルあたり10 mgのウォルトマンニンを含むソフトカプセル剤を調製した。

実施例 4 錠剤

MS-444	200 g
ラクトース	40 g
コーンスターク	18 g
カルボキシメチルセルロースカルシウム	10 g

上記混合物に10%ヒドロキシプロピルセルロース溶液42mlを加

えて練合する。この練合液を 1.0 mm のバスケットを取り付けた押しだし造粒機で造粒し、ステアリン酸マグネシウムを加えて打錠用顆粒とし、常法により 1 錠剤中 (170 mg) に MS-444 を 200 mg 含む 8 mm 径の錠剤とする。

実施例 5 カプセル剤

MS-444	100 g
ラクトース	80 g
ポテトスター ^チ	38 g

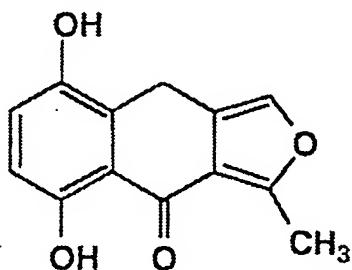
上記混合物に、10% ヒドロキシプロピルセルロース溶液 4.2 mL を加えて練合する。実施例 4 と同様に造粒し、ステアリン酸マグネシウムを加え常法により 1 カプセル (170 mg) 中 MS-444 を 100 mg 含むカプセル剤とする。

実施例 6 ソフトカプセル剤

20 g の MS-444 を 100 g の大豆油に溶かし、得られる溶液を常法によりカプセルに注入することにより、1 カプセルあたり 20 mg の MS-444 を含むソフトカプセル剤を調製する。

請　求　の　範　囲

1. ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤と医薬的に許容される担体とを含有する抗ヒト免疫不全ウイルス（H I V）剤。
2. ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤がウォルトマンニンまたは下式で表されるMS-444



である請求の範囲1記載の抗H I V剤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/01167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ A61K31/34, 31/365, C07D307/92, 493/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ A61K31/34, 31/365, C07D307/92, 493/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 3-215423 (Kyowa Hakko Kogyo K.K.), September 20, 1991 (20. 09. 91), Claim (Family: none)	1, 2

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search September 2, 1993 (02. 09. 93)	Date of mailing of the international search report September 21, 1993 (21. 09. 93)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. CL⁵ A 61K 31/34, 31/365, C 07D 307/92,
493/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. CL⁵ A 61K 31/34, 31/365, C 07D 307/92,
493/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, A, 3-215423 (協和醸酵工業株式会社) 20. 9月. 1991 (20. 09. 91) 特許請求の範囲, (ファミリーなし)	1, 2

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の
 後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために
 引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
 性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
 がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 09. 93

国際調査報告の発送日

21.09.93

名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

宮坂初男

4 C 7 7 2 9

3454

電話番号 03-3581-1101 内線